

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANT: KWANG-WOOK OH, ET AL.)
)
FOR: POLYMERASE CHAIN REACTION DEVICE)
AND METHOD OF REGULATING OPENING)
AND CLOSING OF INLET AND OUTLET OF)
THE POLYMERASE CHAIN REACTION)
DEVICE)

CLAIM FOR PRIORITY

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450


Dear Commissioner:

Enclosed herewith is a certified copy of Korean Patent Application No. 2003-0010729 filed on February 20, 2003. The enclosed Application is directed to the invention disclosed and claimed in the above-identified application.

Applicants hereby claim the benefit of the filing date of February 20, 2003, of the Korean Patent Application No. 2003-0010729, under provisions of 35 U.S.C. 119 and the International Convention for the protection of Industrial Property.

Respectfully submitted,

CANTOR COLBURN LLP

By: 
Soonja Bae
Reg. No. (See Attached)
Cantor Colburn LLP
55 Griffin Road South
Bloomfield, CT 06002
PTO Customer No. 23413
Telephone: (860) 286-2929
Fax: (860) 286-0115

Date: February 19, 2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0010729
Application Number

출 원 년 월 일 : 2003년 02월 20일
Date of Application FEB 20, 2003

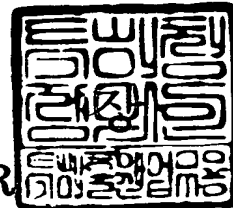
출 원 인 : 삼성전자주식회사
Applicant(s) SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.



2003 년 03 월 07 일

특 허 청

COMMISSIONER





【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0012
【제출일자】	2003.02.20
【국제특허분류】	F15B
【발명의 명칭】	P C R 반응기 및 P C R 반응기의 입구와 출구의 개폐를 조절하는 방법
【발명의 영문명칭】	Polymerase chain reaction device and method for regulating opening or shutting of inlet and outlet of PCR device
【출원인】	
【명칭】	삼성전자 주식회사
【출원인코드】	1-1998-104271-3
【대리인】	
【성명】	이영필
【대리인코드】	9-1998-000334-6
【포괄위임등록번호】	2003-003435-0
【대리인】	
【성명】	이해영
【대리인코드】	9-1999-000227-4
【포괄위임등록번호】	2003-003436-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	오광욱
【성명의 영문표기】	OH,Kwang Wook
【주민등록번호】	720630-1480511
【우편번호】	463-719
【주소】	경기도 성남시 분당구 금곡동 청솔마을 영남아파트 106-902
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	윤대성
【성명의 영문표기】	Y00N,Dae Sung
【주민등록번호】	681111-1067427



【우편번호】	463-010
【주소】	경기도 성남시 분당구 정자동 247-2 101호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이영선
【성명의 영문표기】	LEE, Young Sun
【주민등록번호】	740430-2721917
【우편번호】	449-915
【주소】	경기도 용인시 구성면 언남리 신일아파트 110동 905호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김선희
【성명의 영문표기】	KIM, Sun Hee
【주민등록번호】	701110-2068931
【우편번호】	442-470
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 황골주공아파트 102동 304호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임근배
【성명의 영문표기】	LIM, Geun Bae
【주민등록번호】	650323-1682919
【우편번호】	442-745
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 황골마을풍림아파트 232동 1205호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김영아
【성명의 영문표기】	KIM, Young A
【주민등록번호】	740825-2691619
【우편번호】	442-741
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 황골마을쌍용아파트 245동 1804호
【국적】	KR

**【발명자】**

【성명의 국문표기】 한정임
【성명의 영문표기】 HAN, Jung Im
【주민등록번호】 751222-2119927
【우편번호】 151-847
【주소】 서울특별시 관악구 봉천4동 1582-7
【국적】 KR

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 2
【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 다
리인 이영
필 (인) 대리인
이해영 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	8 면	8,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	0 항	0 원
【합계】		37,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 생화학 유체가 유입되는 입구부, 생화학 유체가 유출되는 출구부, 입구부와 출구부 사이에 위치하는 PCR 반응 채널, 및 각각 입구부와 출구부의 개폐를 조절하는 제 1 및 제 2 마이크로 밸브를 포함하며, 상기 마이크로 밸브는 DNA 변성, 어닐링, 및 신장을 위한 온도보다 낮고 상온보다 높은 온도에서 겔화되는 졸-겔 변환 물질을 포함하는 PCR 반응기를 제공한다.

【대표도】

도 1

【명세서】**【발명의 명칭】**

P C R 반응기 및 P C R 반응기의 입구와 출구의 개폐를 조절하는 방법 {Polymerase chain reaction device and method for regulating opening or shutting of inlet and outlet of PCR device}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 마이크로 밸브가 장착되어 있는 소형화된 실험실 형태의 칩(lab-on-a-chip)의 모식도이다.

도 2는 도 1에 도시된 PCR 반응기에 있어서 마이크로 밸브가 작동되는 원리를 나타낸 모식도이다.

도 3은 본 발명이 마이크로 밸브에 사용되는 졸-겔 변환 물질의 겔화 온도, DNA의 변성 온도, 어닐링을 위한 온도, 그리고 신장을 위한 온도 사이의 관계를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 다른 실시예에 따른 마이크로 밸브를 구비한 PCR 반응기의 모식도이다.

도 5는 도 4에 도시된 PCR 반응기에 있어서 마이크로 밸브의 작동원리를 나타낸 모식도이다.

도 6은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 마이크로 밸브를 구비한 PCR 반응기의 모식도이다.



도 7는 도 6에 도시된 PCR 반응기에 있어서 마이크로 밸브의 작동원리를 나타낸 모식도이다.

도 8 및 도 9는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 마이크로 밸브를 구비한 PCR 반응기의 모식도이다.

도 10은 농도 및 온도에 따른 메틸 셀룰로오스의 전단력의 변화를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 농도 및 온도에 따른 메틸 셀룰로오스의 흡광도의 변화를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 0.5% 메틸 셀룰로오스 및 2% NaCl을 함유하는 용액의 25℃, 35℃, 45℃, 및 60℃에서의 ^1H NMR 스펙트럼이다.

도 13은 0.5% 메틸셀룰로오스를 함유한 샘플을 PCR 반응시킨 후 얻은 PCR 생성물에 대한 전기영동 결과를 나타내는 사진이다.

도 14는 본 발명의 일실시예에 따른 마이크로 PCR 칩을 이용하여 증폭된 PCR 생성물을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

< 도면의 주요부분에 대한 부호의 설명 >

1: PCR 반응기

2a: 제 1 마이크로 밸브, 2b: 제 2 마이크로 밸브

3: 생화학 유체가 유입되는 입구부

4: 생화학 유체가 유출되는 출구부

5: PCR 반응 채널

6: 핵산 추출기

7: 핵산 검출기

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<22> 본 발명은 PCR 반응기에 관한 것으로, 구체적으로는 PCR 반응기의 입구와 출구의 개폐가 용이하게 조절되는 PCR 반응기 및 PCR 반응기의 입구 및 출구의 개폐를 조절하는 방법에 관한 것이다.

<23> PCR 반응기는 핵산을 증폭시키기 위해 변성(denaturation)을 위한 온도, 어닐링(annealing)을 위한 온도, 및 신장(extention)을 위한 온도로의 가열과 냉각을 반복한다. PCR 반응기 내에서 DNA를 변성, 어닐링, 및 신장시키기 위하여 생화학 유체를 가열과 냉각시키는 과정을 반복하는 동안 내압이 발생되며, 이 내압으로 인하여 PCR 반응기 내의 생화학 유체가 누수 또는 증발하게 된다. 이러한 누수 또는 증발을 막기 위하여 PCR 반응기 내에서 생화학 유체의 단속이 필요하다.

<24> 소형화된 실험실 형태의 칩(lab-on-a-chip)은 대부분의 경우 핵산 추출기, PCR 반응기, 및 핵산 검출기로 구성되어 있다. 생화학 유체의 유입을 위해 핵산 추출기가 PCR 반응기의 입구에 연결되고 PCR 반응기의 출구에는 핵산 검출기가 연결된다. 소형화된 실험실 형태의 칩에 있어서 PCR 반응기에서의 핵산 증폭을 위해 가열과 냉각을 반복하는 동안 발생하는 내압으로 인한 생화학 유체의 누수 또는 증발을 막기 위해, 생화학 유체

의 단속을 위한 방법으로 PCR 반응기의 입구와 출구에 밸브를 위치시키는 방법이 이용된다.

<25> 미국 특허 6,168,948 B1 은 PCR 반응기의 입구 쪽에 뉴마틱 밸브(pneumatic valve), 출구 쪽에 기체 투과성 밸브(gas permeable vlave), 및 뉴마틱 밸브에 압착력(compression)을 제공하는 펌프를 포함하는 핵산추출장치를 게시하고 있다. 이 장치에 따르면, PCR 반응기의 입구와 출구 쪽에 탄성이 있는 밸브막과 소수성 밸브막을 미리 형성하여야 하는 번거로움이 있으며, 밸브막을 작동시키기 위한 펌프 등 부수적인 시스템의 추가로 소형화가 어렵다.

<26> 미국 특허 6,168,948 B1은 또한, 다이어프램(diaphragm) 밸브를 사용하는 방법을 게시하고 있다. 다이어프램 밸브의 경우 여러 층의 복잡한 구조와 다이어프램이 필요하며 다이어프램을 변형시키기 위한 외력이 필요하다. 이러한 외력을 인가하기 위하여 전기장, 자기장, 열, 공기압, 피에조(piezo) 등을 이용한다.

<27> 미국 특허 6,130,098은 마이크로 채널 내에 친수성 또는 소수성 표면 처리를 하여 유체의 흐름을 단속하는 방법을 게시하고 있다. 그러나, 이러한 방법을 PCR 반응기에 적용하기는 어렵다. PCR 반응이 이루어지는 온도 구간에서 생화학 유체가 증발을 통해 소수성 표면 처리가 된 마이크로 채널을 쉽게 빠져나갈 수 있기 때문이다.

<28> D.J. Beebe 등(D.J. Beebe, J.S. Moore, Q. Yu, R.H. Liu, M.L. Kraft, B.-H. Jo, 및 C. Devadoss, "Microfluidic tectonics: A comprehensive construction of platform for microfluidic systems", PNAS, 2000년 12월 5일, 97권, No. 25, 13493)은 빛을 이용하여 밸브 구조를 형성할 수 있는 폴리머 물질을 사용하였다.

밸브 구조와 마이크로 채널 구조를 쉽게 형성시킬 수는 있지만, 밸브가 특정 화학물질에 서만 작동하기 때문에 PCR 반응기와 함께 사용하기에는 화학물질에 좌우되는 등의 제약 이 따른다.

<29> Y. Liu 등(Y. Liu, C.B. Rauch, R.L.Stevens, R.Lenigk, J. Yang, D.B.Rhine, 및 P. Grodzinski, "DNA Amplification and Hybridization Assays in Integrated Plastic Monolithic Device", Anal. Chem, 2002, 74, 3063-3070)은 PCR 반응기를 위한 밸브로서 상온에서 결정 형태로 존재하는 플루로닉스 젤(pluronic gel)을 사용하였다. 플루로닉스 젤은 온도에 따라 상변화가 일어나는 폴리머 물질로서, 상온에서는 결정화된 상태로 존재하나 5℃ 이하의 온도에서는 점도가 급격히 낮아져 밸브로서 사용이 가능하다. 그러나, 점도의 급강하가 5℃ 이하에서 일어나기 때문에 밸브의 동작을 위하여 열전자 소자 (Peltier thermoelectric device) 등의 냉각기를 필요로 한다.

<30> 일본 특허 공개 2002-163022는 마이크로 시스템의 미세 유로를 흐르는 유체에, 자극에 의해 졸-젤 전이하는 물질을 첨가하고 미세 유로 상의 원하는 부분에 자극을 주어 유체를 겔화시켜 흐름을 제어하는 것을 특징으로 하는 마이크로 시스템에 있어서의 흐름의 제어방법을 게시하고 있다. 이 방법은 열이나 전압의 인가에 의한 별도의 국소적 자극에 의해 유체가 겔화되어 유체의 흐름을 조절한다.

<31> 미국 특허 6,382,254 B1 은 미세 액체 채널, 적어도 일부분의 미세 유로 채널과 접촉되어 있는 히터, 및 히터의 열에 의해 액체의 점도가 증가되는 졸-젤 변환 물질을 함유하는 운반 액체를 포함하는 미세 액체 밸브를 게시하고 있다. 그러나, 이 밸브 역시 액체의 흐름을 제어하기 위해서는 별도의 히터를 필요로 한다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<32> 본 발명은 -별도의 열원을 필요로 하지 않는 마이크로 밸브에 의해 PCR 반응기의 입구와 출구의 개폐가 이루어지는 PCR 반응기를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<33> 본 발명의 또 다른 목적은 PCR 반응기의 입구와 출구를 용이하게 개폐하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<34> 본 발명은 생화학 유체가 유입되는 입구부(3), 생화학 유체가 유출되는 출구부(4), 입구부와 출구부 사이에 위치하는 PCR 반응 채널(5), 및 각각 입구부와 출구부의 개폐를 조절하는 제 1 및 제 2 마이크로 밸브(2a, 2b)를 포함하며, 상기 마이크로 밸브는 DNA 변성, 어닐링, 및 신장을 위한 온도보다 낮고 상온보다 높은 온도에서 젤화되는 졸-젤 변환 물질을 포함하는 PCR 반응기(1)를 제공한다.

<35> 상기와 같은 졸-젤 변환 물질을 포함하는 PCR 반응기의 입구와 출구의 마이크로 밸브는 각각 입구 또는 출구의 개폐를 조절할 수 있지만 하면 어떠한 형태도 가능하다.

<36> 본 발명은 PCR 반응의 DNA 변성, 어닐링, 및 신장을 위한 온도보다 낮고 상온보다 높은 온도에서 젤화되는 졸-젤 변환 물질을 포함하는 마이크로 밸브를 PCR 반응기의 입구 및 출구와 접촉시키고; PCR 반응을 위한 열원의 열사이클에 따른 온도변화에 의해 상기 마이크로 밸브의 졸-젤 변환을 유발하여 PCR 반응기의 입구와 출구의 개폐를 조절하는 방법을 제공한다.

<37> 본 발명에 따르면, 마이크로 밸브로서 사용되는 물질이 DNA 변성, 어닐링, 및 신장을 위한 온도보다 낮은 온도에서 젤화되므로, 그 작동이 PCR 반응 과정에 의해 자동적으

로 조절될 수 있다. 따라서, 마이크로 밸브의 작동을 위해 별도의 열원이 필요하지 않게 되며, 상온보다 높은 온도에서 겔화되므로 마이크로 밸브의 작동을 멈추게 하기 위한 별도의 냉각기가 필요하지 않게 된다. 즉, PCR 반응에 사용되는 열에 의해서 마이크로 밸브의 작동이 자동적으로 조절될 수 있는 것이다. 마이크로 밸브에 사용되는 물질로는 이러한 졸-겔 변환 특성을 나타내는 것이라면 어느 것도 사용될 수 있으며, 그러한 대표적인 졸-겔 변환 물질로는 메틸 셀룰로오스가 있다.

<38> 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<39> 도 1은 본 발명의 PCR 반응기를 포함하는 랩온어칩의 모식도이다.

<40> 본 발명의 PCR 반응기는, 도 1에 도시된 바와 같이, 입구부(3), 출구부(4), 입구부와 출구부 사이에 위치하는 PCR 반응 채널(5), 입구부와 출구부의 개폐를 조절하는 제 1 마이크로 밸브(2a)와 제 2 마이크로 밸브(2b), 그리고 PCR 반응기와 마이크로 밸브를 작동시키기 위한 열원(미도시)으로 구성된다. PCR 반응기의 입구부(3)와 출구부(4)에는 핵산추출기(6)와 핵산검출기(7)가 각각 연결된다.

<41> 상기 PCR 반응기의 마이크로 밸브는 졸-겔 변환물질을 포함하며, 상기 졸-겔 변환 물질로는 PCR 반응의 DNA 변성, 어닐링, 및 신장을 위한 온도보다 낮고 상온보다 높은 온도에서 겔화되는 물질을 사용한다.

<42> 본 발명의 졸-겔 변환 물질의 겔화 온도, DNA의 변성 온도, 어닐링을 위한 온도, 그리고 신장을 위한 온도들 사이의 관계를 도 3에 나타내었다. 이러한 졸-겔 변환 물질은 그 겔화 온도가 PCR 반응을 위한 온도 구간 보다 항상 낮고 상온보다는 높기 때문에 별도의 열원 없이 PCR 반응을 위해 이용되는 열원에 의해 PCR 반응 과정에서 마이크로

밸브로서 작용할 수 있다. PCR 반응이 일어나기 전, 즉 상온에서는 졸-겔 변환 물질이 졸 상태로 존재하고 있다가, PCR 반응을 위한 온도 구간에서는 PCR 반응기에서 제공되는 열원에 의해 겔화가 일어나게 되어 고체 상태로 변화하게 된다. 졸 상태이던 물질이 고체 상태가 되면 PCR 반응기내의 생화학 유체의 누수나 증발을 막을 수 있어 마이크로 밸브 역할을 하게 된다. PCR 반응이 완료되어 상온으로 온도가 내려가게 되면, 고체 상태에서 졸 상태로 상변화가 일어나 PCR 반응기 내의 생화학 유체를 출구부 또는 검출기 쪽으로 쉽게 이동시킬 수 있게 된다.

<43> 본 발명의 PCR 반응기의 마이크로 밸브로서 사용 가능한 물질로는 메틸셀룰로오스가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 메틸 셀룰로오스는 겔화되기 위한 온도가 PCR 반응을 위해서 필요한 온도보다 낮고 상온보다 높기 때문에 부가적인 열원이나 냉각기 없이 PCR 반응이 시작되면 자동으로 마이크로 밸브로 작용하게 된다.

<44> 본 발명의 마이크로 밸브의 작동, DNA 변성, 어닐링 및 신장을 위한 온도를 제공 및 유지하기 위한 열원으로서 플라티늄(Pt), 알루미늄(Al), 구리(Cu)와 같은 얇은 금속막에 전류를 흘려 발생된 저항열을 사용할 수도 있으며, 이외에도 열전자 소자, IR, 또는 교류전압을 이용할 수도 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

<45> 본 발명의 PCR 반응기는 도 1에 나타난 바와 같이, 핵산 추출기(6) 및 핵산 검출기(7)와 연결되어 사용될 수 있다. 핵산 추출기(6)에서 시료 중의 원하는 핵산을 추출한 다음 PCR 반응기에서 증폭반응을 거치고, 이어서 증폭된 핵산이 핵산 검출기(7)를 통과하면서 검출된다.

<46> 도 2는 도 1에 도시된 PCR 반응기에 있어서 마이크로 밸브가 작동되는 원리를 나타낸 모식도이다. 원하는 양의 생화학 유체를 PCR 반응기(1)의 입구부(3)을 통해 주입한

다. 상기 생화학 유체가 PCR 반응 채널로 흘러 들어가 채널을 채우게 되면 제 1 마이크로 밸브(2a) 및 제 2 마이크로 밸브(2b)에 상기 졸-겔 변환물질을 주입하고 PCR 반응을 위한 열 사이클을 작동시킨다. 그에 따라, PCR 반응이 일어남과 동시에 마이크로 밸브가 겔화되어 생화학 유체가 PCR 반응 채널(5) 내에 단속된다. 그리하여, PCR 반응 시 생화학 유체의 누출이나 증발로 인한 PCR 반응의 수율의 저하가 방지될 수 있다.

<47> 본 발명의 마이크로 밸브는 PCR 반응기의 입구부 및 출구부에 위치시킬 수 있으며, 입구부와 출구부에서 마이크로 밸브로서의 역할을 수행할 수 있다면 어떠한 형태도 가능하다. 본 발명의 마이크로 밸브는 도 1에 도시한 바와 같이 PCR 반응기의 입구부 및 출구부와 교차하는 채널 형태일 수 있다.

<48> 본 발명의 마이크로 밸브는 여러 가지 형태로 제조될 수 있으며, 그 예가 도 4 내지 도 9에 도시되어 있다.

<49> 도 4는 PCR 반응기 입구부(3) 및 출구부(4) 자체에 위치하는 제 1 마이크로 밸브(2a) 및 제 2 마이크로 밸브(2b)를 갖는 PCR 반응기의 모식도이다. 마이크로 밸브와 PCR 반응기의 입구부 및 출구부가 일체화된 구조로서, 마이크로 밸브가 별도의 구조물로서 형성될 필요가 없다. 이러한 구조의 변형예로서, 마이크로 밸브가 생화학 유체가 PCR 반응기의 입구부 및 출구부로부터 각각 유입 및 유출되는 방향과 동일한 방향으로 연장되어 있는 형태도 가능하다.

<50> 도 4에 도시된 형태의 마이크로 밸브는 도 5에 나타낸 바와 같은 원리에 의해 작동될 수 있다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 먼저 졸-겔 변환 물질을 PCR 반응기의 입구에 주입한 다음, 증폭하고자 하는 핵산을 포함하는 생화학 유체를 주입하고 마지막으로 졸-겔 변환 물질을 주입하여 입구부와 출구부에 각각 졸-겔 변환 물질을 위치시키면, PCR

반응의 개시와 함께 졸-겔 변환 물질이 겔화되어 입구보다 출구부를 밀폐시키는 마이크로 밸브로 작용하게 된다.

<51> 도 6에는, 생화학 유체가 PCR 반응기의 입구부 및 출구부로부터 유입 및 유출되는 방향과는 다른 방향으로 PCR 반응기 입구부 및 출구부에 각각 연결되는 형태의 마이크로 밸브를 갖는 PCR 반응기의 모식도가 도시되어 있다.

<52> 도 6에 도시한 형태의 마이크로 밸브는 도 7에 나타난 바와 같은 원리에 의해 작동될 수 있다. 도 7에 도시된 바와 같이, 우선 증폭하고자 하는 핵산을 포함하는 생화학 유체를 PCR 반응 채널(5)에 채우고, 제 1 마이크로 밸브(2a) 및 제 2 마이크로 밸브(2b)를 통해 졸-겔 변환 물질을 주입시켜 PCR 반응기의 입구부(3)와 출구부(4)에 마이크로 밸브를 형성한다. 따라서, PCR 반응기 개시됨에 따라 마이크로 밸브에 의해 입구부와 출구부가 밀폐되어 생화학 유체의 증발, 누출 없이 원하는 양만큼 증폭될 수 있고, 그런 다음 반응을 완료하여 상온으로 온도가 내려가면 졸-겔 변환물질이 졸화되어 입구부와 출구부가 개방되므로 생화학 유체가 출구를 통해 유출된다.

<53> 도 8은 제 1 마이크로 밸브(2a) 및 제 2 마이크로 밸브(2b)가 PCR 반응기의 입구부(3) 및 출구부(4)와 각각 교차 연결되고 제 1 마이크로 밸브(2a)의 일단과 제 2 마이크로 밸브(2b)의 일단이 연결되어 있는 형태의 마이크로 밸브를 갖는 PCR 반응기의 모식도이다.

<54> 도 8에 도시된 마이크로 밸브는 우선 증폭하고자 하는 핵산을 포함하는 생화학 유체를 PCR 반응 채널(5)에 채우고, 제 1 마이크로 밸브(2a) 및/또는 제 2 마이크로 밸브(2b)를 통해 졸-겔 변환 물질을 주입시켜 PCR 반응기의 입구부(3)와 출구부(4)에 마이크로 밸브를 형성한다. 따라서, PCR 반응기 개시됨에 따라 마이크로 밸브에 의해 입구부

와 출구부가 밀폐되어 생화학 유체의 증발, 누출 없이 원하는 양만큼 증폭될 수 있고, 그런 다음 반응을 완료하여 상온으로 온도가 내려가면 졸-겔 변환물질이 졸화 되어 입구부와 출구부가 개방되므로 생화학 유체가 출구를 통해 유출된다.

<55> 도 9는 제 1 마이크로 밸브(2a) 및 제 2 마이크로 밸브(2b)가 각각 복수 개의 PCR 반응기의 입구부(3) 및 출구부(4)와 교차 연결되고 제 1 마이크로 밸브 및 제 2 마이크로 밸브가 서로 연결된 형태의 마이크로 밸브를 갖는 PCR 반응기의 모식도이다. 복수 개의 PCR 반응기를 포함하는 랩온어칩에 있어서, 복수 개의 PCR 반응기의 각각의 입구부와 출구부에 마이크로 밸브가 연결될 수 있다. 입구부를 연결하는 마이크로 밸브와 출구부를 연결하는 마이크로 밸브는 다시 연결될 수 있다. 마이크로 밸브에 졸-겔 변환 물질을 주입하면 복수 개의 PCR 반응기의 입구부 및 출구부와 교차되는 하나의 마이크로 밸브가 형성되어 복수 개의 PCR 반응기를 동시에 단속할 수 있게 된다.

<56> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<57> 실시예 1

<58> 메틸셀룰로오스의 가역적 졸-겔 전이

<59> 실험실 등급의 메틸셀룰로오스 분말을 Aldrich 화학회사에서 구입하였다. 제조자가 제공한 데이터에 따르면, 2% 메틸 셀룰로오스의 점도는 실온에서 400cP, 평균 분자량은 130,000, 다분산성 지수는 1.8이고, 메틸 라디칼의 평균 치환은 2.1이다. 도 10에

나타낸 바와 같이, 각각 0.5Wt%, 1.0Wt%, 1.5Wt%, 2.0Wt%가 되도록 메틸셀룰로오스를 4℃의 탈이온수에 용해시키고 24시간 동안 방치하여 완전히 용해시켰다.

<60> 상기 용액의 온도 및 농도에 따른 유동학적 특성을 측정하였다. 스트레스 조절 점도계(Carrimed CS50)를 사용하여 유동학적 특성을 측정하였다. 또한, UV/VIS 흡광 스펙트럼을 측정함으로써 겔화 온도를 측정하였다. 메틸셀룰로오스 용액의 겔화는 메틸셀룰로오스의 탁도에 영향을 미치는 상분리에 의한다. 700nm 파장에서의 흡광도 스펙트럼을 multispec-1501 UV/VIS 분광광도계(Shimadzu)를 이용하여 측정하였다.

<61> 메틸셀룰로오스 용액을 겔 밸브의 작동 용액으로 사용할 수 있는지의 여부를 확인하기 위해 용액의 온도-의존적 특성을 우선 평가하였다. 이를 위해, 상기 제조한 각 용액에 대한 동역학적 유동성을 온도를 변화시켜 가면서 측정하였다.

<62> 스트레스 조절 점도계(Carrimed CS50)를 사용하여 온도 및 농도에 따른 전단력의 변화를 측정한 결과를 도 10에 나타내었다. 도 10의 그래프는 모든 조건에서 온도의 상승에 따라 전단력이 증가한다는 것을 보여준다. 첫 겔화는 약 35℃에서 이루어졌다. 온도가 증가함에 따라, 50℃까지 1.0 wt% 이상인 용액의 전단력은 급격히 증가했지만 0.5 wt% 용액의 전단력은 서서히 증가하였다.

<63> 상기 제조한 용액에 대해 700nm 파장에서의 온도 변화에 따른 흡광도 스펙트럼을 측정한 결과를 도 11에 나타내었다. 도 11에 나타낸 바와 같이, 흡광도 스펙트럼 결과에 의하면 55℃ 이후에 흡광도가 급격히 증가한 것으로 보아 약 55℃가 겔화 온도라고 판단된다. 그러나, 상기 전단응력을 측정한 유동학 연구 결과와 흡광도를 측정한 광학적 연구 결과는 겔화 온도에 있어서 큰 차이를 보였다. 0.5 wt% 용액의 경우에, 겔화 온도의 차이는 약 20℃인 것으로 나타났다.

<64> 이러한 결과는 흡광도가 35℃ 내지 55℃의 온도 범위에서 일정하게 유지되는 동안 점도는 계속해서 증가함을 의미한다. 이러한 결과로부터 메틸 셀룰로오스는 온도의 증가에 의해 맑은 졸로부터 맑은 겔을 거쳐 탁한 겔로 전이되는 것을 알 수 있다. 즉, 광학적 연구는 메틸 셀룰로오스의 정확한 겔화 지점을 제공하지 못했다. 따라서, 유동학 연구의 결과가 겔 밸브를 작동시키는데 필요한 물질의 특성의 근거로서 사용될 수 있음을 알 수 있다.

<65> 유동학적 특성을 측정하기 위한 또 하나의 방법으로, 메틸셀룰로오스의 화학결합의 온도-의존적 변화를 NMR을 이용하여 평가하였다. 0.5% 메틸 셀룰로오스 및 2% NaCl을 함유하는 용액을 25℃, 35℃, 45℃, 및 60℃에서 ^1H NMR을 측정하여 얻은 ^1H NMR 스펙트럼을 도 12에 나타내었다.

<66> 35℃보다 높은 온도에서 피크 강도의 감소가 관찰되었다. 이것은 체인의 유동성의 점진적인 감소를 나타낸다. 피크 강도의 감소는 메틸기가 양성자로 치환된 것에 의한 것이다.

<67> 실시에 2

<68> 메틸 셀룰로오스의 PCR 반응 억제 여부 평가

<69> 10 x PCR 완충용액(750 mM Tris-HCl(pH 9.0), 150mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25mM MgCl_2 , 1mg/ml BSA), 250 μM dNTP, 500nM 상향 프라이머(5'-cccttgctgagcagatcccgtc-3') 및 하향 프라이머(5'-gggatggtgaagcttccagcc-3'), 500ng 인간 게놈 DNA와 4.8 μl /100 μl 의 Taq DNA 폴리머라제 (28:1 TaqStartAb+Taq DNA polymerase)를 포함한 PCR 용액을 제조하였다.

<70> 상기 PCR 용액에 0.5% 메틸 셀룰로오스 용액을 총 PCR 용액 100 μ l의 양 대비 0 (0.5% 메틸 셀룰로오스 0 μ l) 내지 5% (0.5% 메틸 셀룰로오스 5 μ l)가 되도록 첨가하였다. 이와 같이 제조된 PCR 반응액 100 μ l를 이용하여 DNA 열 사이클러 (Eppendorf 사)에서 PCR 반응을 실시하였다.

<71> PCR 반응은 95℃에서 3분간 반응시킨 뒤, 95℃에서 30초, 55℃에서 15초, 72℃에서 1분간을 유지시키는 것을 40회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 3분 동안 반응시켰다. 증폭된 PCR 생성물을 정량하여 하기 표 1에 나타내었다.

<72> [표 1]

<73>

#	중량(ng)	평균중량(ng)
0%	168,152	170,22
0%	172,288	
1%	185,175	172,1665
1%	159,158	
2%	172,086	170,687
2%	169,288	
3%	178,968	174,2535
3%	169,539	
4%	177,369	175,1705
4%	172,972	
5%	167,588	167,6405
5%	167,693	
N	-0,188	
P	160,369	160,369

<74> N: 음의 대조군(0.5 % 메틸 셀룰로오스는 첨가되어 있으나 인간 게놈 DNA가 첨가되어 있지 않은 경우)

- <75> P: 양의 대조군(0.5 % 메틸 셀룰로오스는 첨가되어 있지 않으나, 인간 게놈 DNA는 첨가되어 있는 경우)
- <76> 증폭된 PCR 생성물은 0.5X TAE에서의 2% 아가로오스 겔(SeaKem LE)을 사용하여 검출하였다. 10ml의 아가로오스 겔 당 $1\mu\text{g}$ 의 에티디움 브로마이드(EtBr)를 가하였다. 100V로 30분 동안 100bp 래더(ladder)(G210A; Promega)와 함께 전기영동하여 PCR 생성물을 확인하였다. 0.5% 메틸셀룰로오스를 함유한 시료를 실험하였을 때, UV 305nm에서 PCR 생성물을 확인한 결과의 사진을 도 13에 나타내었다.
- <77> 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 0 내지 5%의 메틸 셀룰로오스를 함유하는 PCR 반응물의 정량 결과로부터 메틸 셀룰로오스 용액은 5% 이하의 농도에서 PCR 반응을 저해하지 않음을 알 수 있다.
- <78> 실시예 3
- <79> 마이크로 PCR 칩
- <80> 본 발명에서 제안된 졸-겔 마이크로 밸브를 이용하여 DNA 증폭반응 실험을 하였다. PCR 칩으로는 실리콘과 글래스가 접합이 되어 있는 마이크로 칩을 사용하였다. 상기 마이크로 칩은 실리콘 쪽에 $1\mu\text{l}$ 의 채널이 형성되어 있으며, 실리콘 채널 쪽의 뒷면에는 플라티늄 히터가 장착되어 있다. 글래스 쪽에는 입구부와 출구부가 형성되어 있다. 시료는 실시예 3에서 사용된 시료와 동일한 시료를 사용하였다. 졸-겔 변환물질로는 0.5% 메틸 셀룰로오스를 사용하였다.
- <81> 우선 캐필러리 튜브에 0.5% 메틸 셀룰로오스 $1\mu\text{l}$, 시료 $1\mu\text{l}$, 0.5% 메틸 셀룰로오스 $1\mu\text{l}$ 를 순차적으로 채웠다. 순차적으로 채워진 캐필러리 튜브를 PCR 칩의 주입구쪽에

연결하여 채워진 용액을 PCR 칩의 채널로 이동시켰다. 이동시킨 후 히터에 전력을 가하여 시료 내의 DNA가 증폭되도록 실험을 행하였다.

<82> PCR 반응은 95℃에서 3분간 반응시킨 뒤, 95℃에서 30초, 55℃에서 15초, 72℃에서 1분간을 유지시키는 것을 40회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 3분 동안 반응시켰다.

<83> 상기 PCR 반응의 결과 증폭된 생성물을 애질런트 생분석기(Agilent bioanalyser)로 전기영동 방법으로 분석하고 그 결과를 도 14에 나타내었다. 본 발명에서 제안된 마이크로 밸브를 이용한 PCR 칩을 이용하여 DNA를 증폭할 수 있음을 보여 주고 있다.

<84> 또한, 상기 실험 시 DNA를 포함한 생화학 유체가 PCR 반응 채널에 유입된 후 PCR 반응 동안, 생화학 유체의 누출 및 증발이 발생하지 않는 것을 확인하였다.

【발명의 효과】

<85> 본 발명에 따르면, 별도의 열원이 필요하지 않은 마이크로 밸브에 의해 PCR 반응기의 입, 출구를 단속할 수 있으므로, 아주 간단한 마이크로 밸브의 구조가 가능하여 PCR 반응기를 마이크로 칩 상에 용이하게 구현할 수 있다. 그리하여, 랩온어칩(lab-on-a-chip) 상에 구현 가능하기 때문에 기존의 실리콘, 유리, 폴리머 등의 미세 가공 기술을 이용할 수 있다. 또한, PCR 반응기의 전체 시스템의 크기가 현저히 작아지게 되어 휴대용으로 제작이 가능하다.

<86> 뿐만 아니라, 본 발명과 같이 마이크로 밸브로 PCR 반응기의 생화학 유체를 단속한다면 생화학 유체의 손실을 막을 수 있게 되므로 항상 정해진 일정량의 생화학 유체를 이용하여 DNA를 증폭할 수 있는 장점이 있다. 많은 경우 미량(mL ~ pL)의 생화학유체를 다루기 위하여 복잡한 구조의 소형 미터기(micro metering system)를 사용하기도 하지만

, 본 발명의 방법에 따르면 졸-겔 변환물질을 주입하기만 하면, 입구와 출구 쪽의 마이크로 밸브 사이에 위치한 PCR 반응기에 채워진 생화학 유체의 양이 정해지게 된다. 즉, 졸-겔 변환 물질을 주입함으로써 증폭시키고자 하는 생화학 유체의 증발을 막기 위한 단속 기능과 항상 정확한 양을 주입하는 미터링 기능을 동시에 행할 수 있다. 이와 함께 항상 정확한 양을 주입할 수 있어 불필요한 생화학 유체의 낭비를 막을 수 있는 이점이 있다.

<87> 또한, 본 발명의 마이크로 밸브를 사용하면, 증폭과 동시에 자동으로 밸브 역할을 하게 되며 증폭이 끝남과 동시에 자동으로 밸브 역할이 끝나기 때문에, 증폭이 끝난 후에 쉽게 용액을 다음 공정으로 이동시킬 수 있어 사용이 용이하다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

생화학 유체가 유입되는 입구부, 생화학 유체가 유출되는 출구부, 입구부와 출구부 사이에 위치하는 PCR 반응 채널, 및 각각 입구부와 출구부의 개폐를 조절하는 제 1 및 제 2 마이크로 밸브를 포함하며, 상기 마이크로 밸브는 DNA 변성, 어닐링, 및 신장을 위한 온도보다 낮고 상온보다 높은 온도에서 겔화되는 졸-겔 변환 물질을 포함하는 PCR 반응기.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 졸-겔 변환 물질은 메틸 셀룰로오스인 것을 특징으로 하는 PCR 반응기.

【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 마이크로 밸브는 PCR 반응기의 입구부 및 출구부에 위치하는 것을 특징으로 하는 PCR 반응기.

【청구항 4】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 마이크로 밸브는 생화학 유체가 상기 입구부 및 출구부로부터 유입 및 유출되는 방향과 동일한 방향으로 연장되어 있는 것을 특징으로 하는 PCR 반응기.

【청구항 5】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 마이크로 밸브는 PCR 반응기의 입구부 및 출구부로부터 유입 및 유출되는 방향과는 다른 방향으로 PCR 반응기의 입구부 및 출구부에 각각 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 PCR 반응기.

【청구항 6】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 마이크로 밸브는 각각 PCR 반응기의 입구부 및 출구부와 교차 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 PCR 반응기.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 제 1 마이크로밸브의 일단과 제 2 마이크로밸브의 일단이 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 PCR 반응기.

【청구항 8】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 마이크로 밸브는 각각 복수 개의 PCR 반응기의 입구부 및 출구부와 교차 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 PCR 반응기.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 제 1 마이크로밸브의 일단과 제 2 마이크로밸브의 일단이 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 PCR 반응기.

【청구항 10】

PCR 반응의 DNA 변성, 어닐링, 및 신장을 위한 온도보다 낮고 상온보다 높은 온도에서 겔화되는 졸-겔 변환 물질을 포함하는 마이크로 밸브를 PCR 반응기의 입구 및 출구

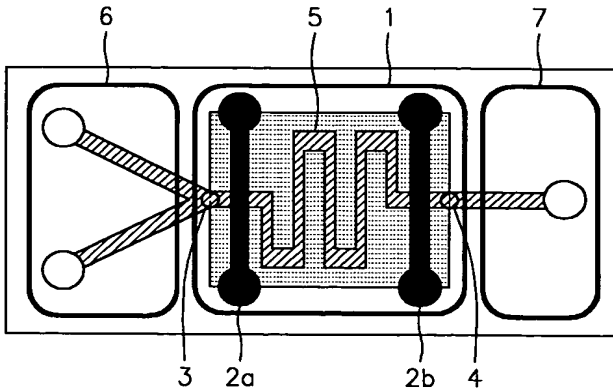
와 접촉시키고; PCR 반응을 위한 열원의 열사이클에 따른 온도변화에 의해 상기 마이크로 밸브의 졸-겔 변환을 유발하여 PCR 반응기의 입구와 출구의 개폐를 조절하는 방법.

【청구항 11】

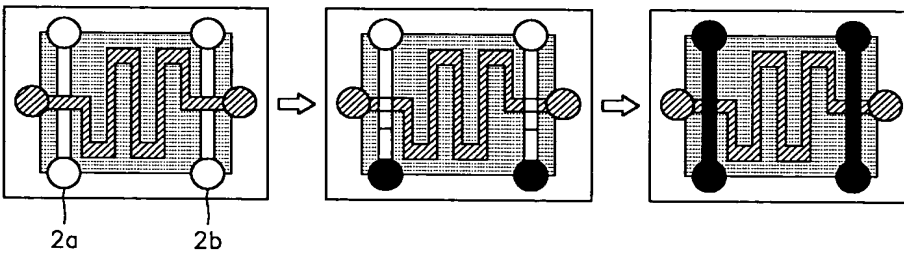
제 10 항에 있어서, 상기 졸-겔 변환 물질은 메틸셀룰로오스인 것을 특징으로 하는 방법.

【도면】

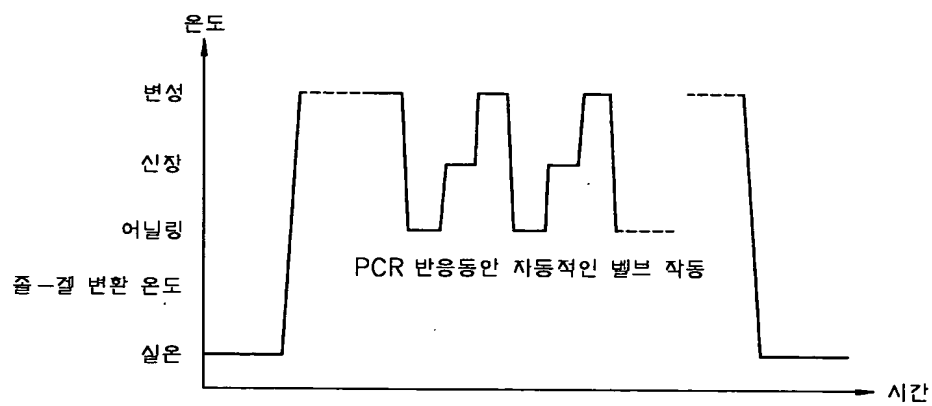
【도 1】



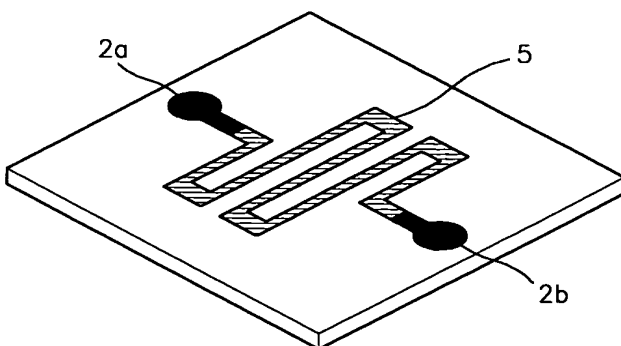
【도 2】



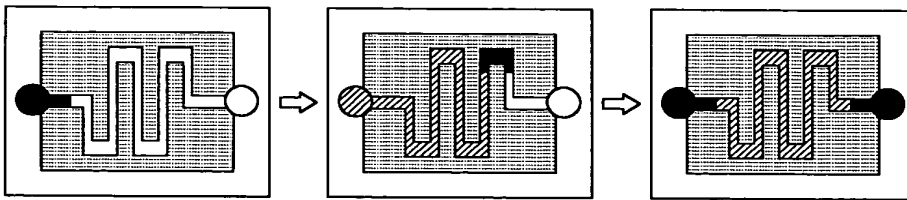
【도 3】



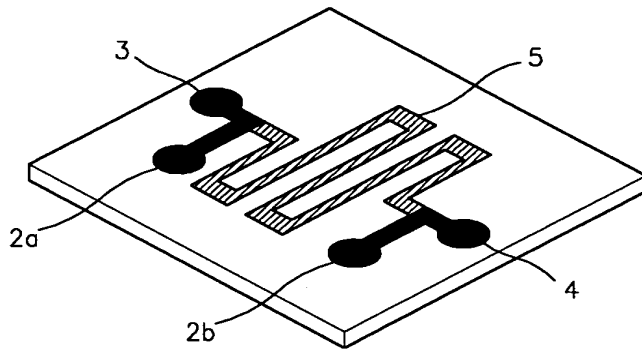
【도 4】



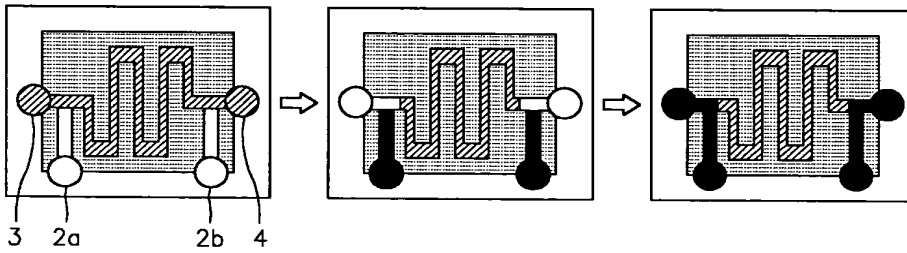
【도 5】



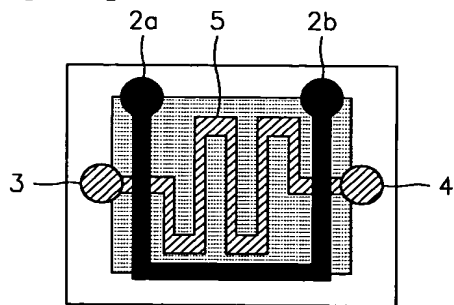
【도 6】



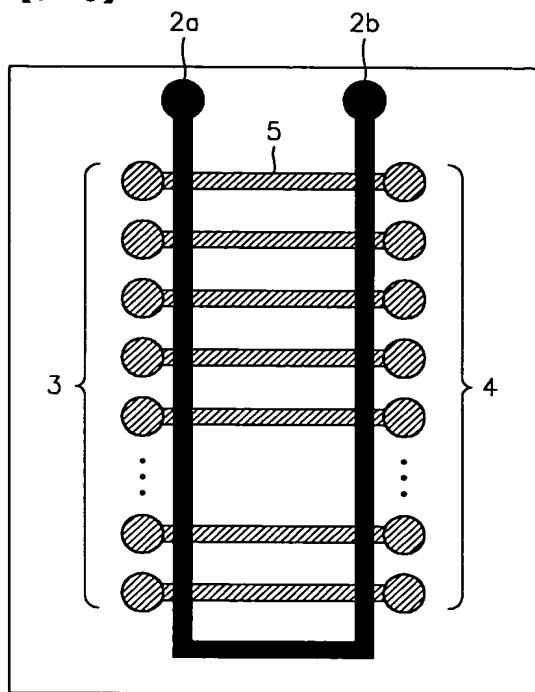
【도 7】



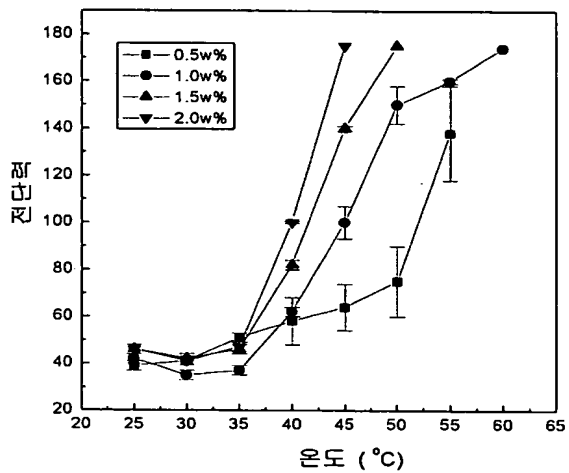
【도 8】



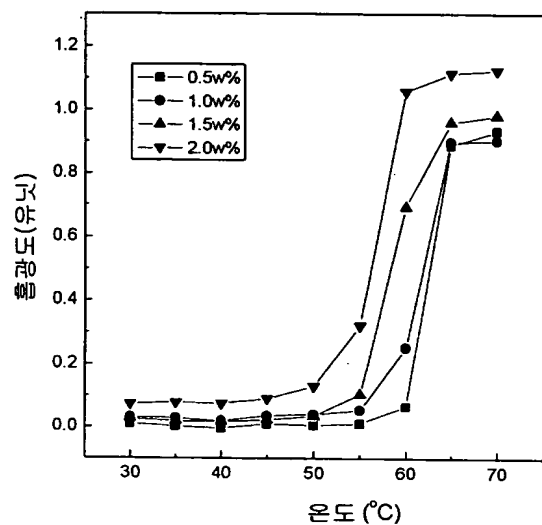
【도 9】



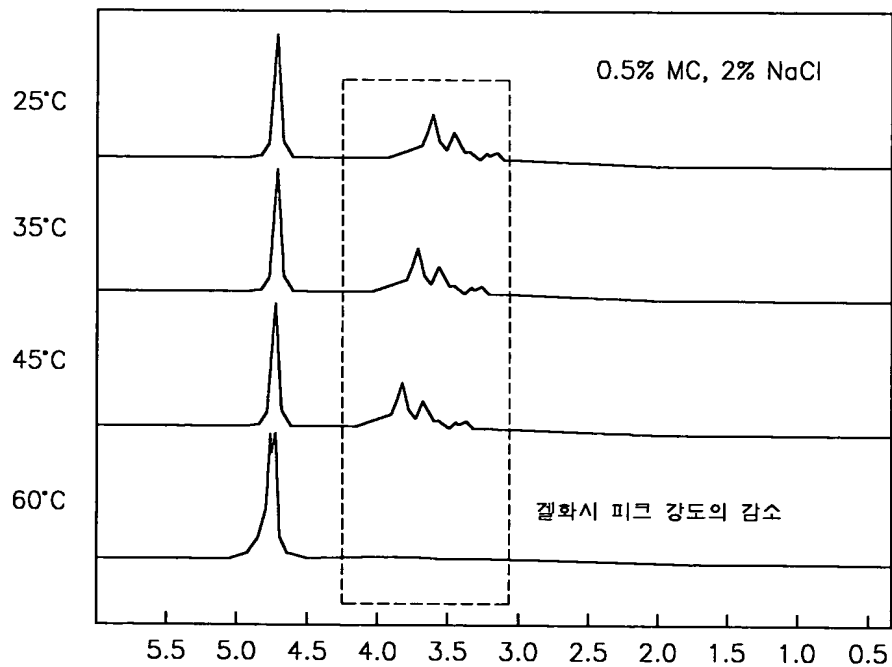
【도 10】



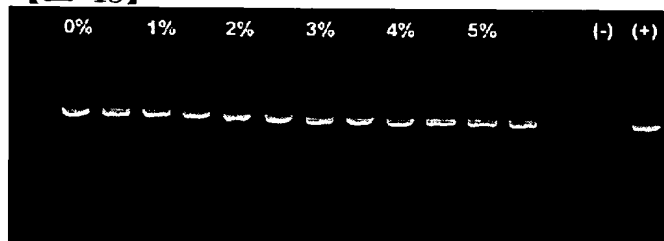
【도 11】

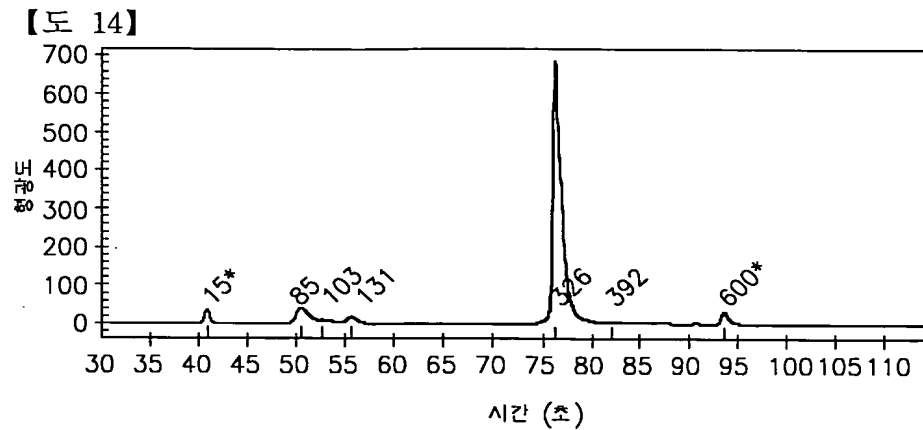


【도 12】



【도 13】





【서열목록】

<110> SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD <120> Polymerase chain reaction device and method for regulating opening or shutting of inlet and outlet of PCR device

<130> SI004227 <160> 2 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> forward primer for PCR <400> 1

cccttgctga gcagatcccg tc 22 <210>

2 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for PCR <400> 2

gggatggtga agcttccagc c

21